

3. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Soerjanto Orchids Batu dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian dan Laboratorium Program Doktor Biologi MIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan di bulan Maret- September 2017. Parameter pengamatan yaitu pengamatan morfologi, anatomi dan sitologi.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit anggrek *Phalaenopsis pulcherrima* yang diperbanyak melalui biji dihasilkan dari persilangan antar spesies yang sama, spesies ini secara genetik sudah seragam, memiliki 4-5 daun dan memiliki 3-6 akar. Umur bibit yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit anggrek yang telah diaklimatiasi selama satu bulan.

Bahan yang digunakan untuk uji sitologi adalah akar bibit tanaman anggrek *Phalaenopsis pulcherrima*, dengan 8-Hidroquinolin, Asam asetat 45%, HCL 1N , *aceto-orcein* 2% , aquades, dan cat kuku yang tidak berwarna, oil immersion lens. Bahan lain yang digunakan adalah spirtus, fungisida, insektisida dan mos putih. Peralatan yang digunakan di laboratorium yaitu waterbath, gelas arloji, pipet, pinset, gelas ukur, bunsen dan lain-lain. Peralatan yang digunakan untuk uji sitologi yaitu mikroskop cahaya, silet, lemari pendingin, pensil dengan ujung penghapus, pinset dan gelas kimia, cover glass, kaca preparat, waterbath. Peralatan lain yang digunakan adalah tray, cup plastik, plastik transparan.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan percobaan Rancangan Acak Kelompok (RAK) terdiri dari enam perlakuan konsentrasi dengan empat kali ulangan. Pada setiap perlakuan dalam empat ulangan masing-masing terdiri dari lima bibit dan masing-masing lubang tray berisi satu bibit. Dengan demikian total bibit yang digunakan dalam penelitian ini 120 bibit. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

K0 : Konsentrasi 0 ppm (Kontrol)

K1 : Konsentrasi 1000 ppm

K2 : Konsentrasi 2000 ppm

K3 : Konsentrasi 3000 ppm

K4 : Konsentrasi 4000 ppm

K5 : Konsentrasi 5000 ppm

3.4 Pelaksanaan percobaan

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahapan, yaitu

1. Persiapan Bibit

Bibit anggrek yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit yang telah diaklimatisasi selama 1 bulan. Memiliki 4-5 daun dan 3-6 akar. Selanjutnya bibit di pindah tanam pada media mos putih yang dimasukkan pada cup plastik bening yang berukuran 5 cm, setelah itu bibit ditanam dan kemudian diletakkan pada tray semai.

2. Pembuatan Larutan Kolkisin

Larutan stok kolkisin dibuat dengan menimbang 250 mg serbuk kristal kolkisin yang kemudian dilarutkan dengan etanol dan ditambahkan dengan 50 ml aquades yang dilakukan didalam laminar air flow cabinet (LAFC). Setelah dibuat larutan stok, kemudian larutan dibuat pada gelas ukur dengan mencampur larutan kolkisin dengan aquades yaitu konsentrasi 1000 ppm (0,1 ml kolkisin + 0,4 ml aquades), 2000 ppm (0,2 ml kolkisin + 0,3 ml aquades), 3000 ppm (0,3 ml kolkisin+ 0,2 ml aquades), 4000 ppm (0,4 kolkisin + 0,1 aquades) dan 5000 ppm (0,5 kolkisin). Pengambilan larutan kolkisin sesuai konsentrasi dilakukan dengan menggunakan injeksi spuit yang berkapasitas 1 ml dengan pembagian skala sampai 0,01 ml.

3. Perlakuan kolkisin

Perlakuan kolkisin dilakukan setelah bibit diadaptasikan selama 2 minggu . Bibit ditetesi kolkisin sesuai konsentrasi perlakuan sebanyak 0,01 ml pertanaman. Penetasan dilakukan pada titik tumbuh, setelah ditetesi bibit anggrek disungkup menggunakan plastik transparan agar penguapan kolkisin tetap berada diarea bibit tanaman yang sedang diperlakukan sehingga dapat diserap dengan baik oleh tanaman serta menjaga kelembaban. Penyungkupan dilakukan selama evapotranspirasi mulai dari pagi hari hingga ke sore hari.



Gambar 6. Titik tumbuh bibit anggrek *Phalaenopsis pulcherrima*

4. Pemeliharaan

Pemeliharaan yang dilakukan dengan penyiraman penuh pada tanaman yang dilakukan selama satu kali dalam satu minggu. Selain itu, bibit juga diberikan fungisida dan insektisida sebanyak 2 g L⁻¹ setiap satu kali dalam dua minggu untuk pencegahan penyakit yang disebabkan oleh cendawan serta hama yang menyerang.

3.5 Pengamatan Percobaan

Pengamatan dilakukan pada setiap perlakuan. Pengamatan dibedakan menjadi tiga yaitu pengamatan morfologi, pengamatan anatomi dan pengamatan sitologi.

1. Pengamatan Morfologi

- a) Umur mulai muncul daun baru (HSP) dihitung saat daun tumbuh dari hari setelah perlakuan.
- b) Jumlah daun per tanaman yaitu menghitung jumlah daun yang membuka sempurna (helai).
- c) Tebal daun yaitu mengukur tebal daun bagian atas pada setiap tanaman secara non destruktif dengan menggunakan jangka sorong (mm).
- d) Warna daun yaitu melihat warna daun dengan menggunakan Pantone Colour Chart

- e) Jumlah akar baru per tanaman yaitu menghitung jumlah akar yang tumbuh (helai).
- f) Tinggi tanaman yaitu mengukur tanaman dari ruas kotiledon sampai ujung atas tanaman (cm).
- g) Panjang tanaman yaitu mengukur dari ujung akar sampai ujung atas tanaman (cm).
- h) Persentase hidup tanaman yaitu mengamati secara non destruktif kondisi tanaman yang hidup dan tak hidup.

2. Pengamatan Anatomi

Menurut Haryanti, (2010) Analisis anatomi dilakukan dengan cara sampel daun dipotong dengan ukuran 1 cm x 0,5 cm, kemudian permukaan bawah daun diolesi dengan cat kuku bening dan didiamkan selama 10 menit, tujuan pemberian cat kuku bening ini adalah sebagai penanda (terjiplak pada selotip) serta mempertahankan stomata agar tetap terbuka. Lalu potong selotip transparan dengan ukuran panjang ± 2 cm. Setelah itu selotip ditempelkan pada daun yang terolesi oleh cat kuku, kemudian selotip yang telah menempel pada daun ditarik dan ditempelkan lagi pada kaca preparat, selanjutnya diberi label kemudian diamati pada mikroskop dengan perbesaran 400x.

Variabel Pengamatan :

- a) Kerapatan stomata yaitu diamati stomata bagian epidermis bawah daun menggunakan mikroskop cahaya (jumlah/ mm²).
- b) Panjang stomata yaitu mengukur panjang *guardcell* stomata pada bagian epidermis bawah daun.
- c) Lebar stomata yaitu mengukur lebar *guardcell* stomata pada bagian epidermis bawah daun.

3. Pengamatan Sitologi

Analisis kromosom dilakukan menggunakan Manton (1950) yang telah dimodifikasi oleh Eka *et al.* (2015) prosedur pengamatan sitologi adalah untuk mengetahui jumlah kromosom. Menghitung jumlah kromosom dapat dilakukan dengan cara merendam ujung akar sepanjang 0,5-1cm didalam 8-Hydroxyquinolin 0,002 M selama 24 jam didalam lemari pendingin ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) . Kemudian direndam dengan menggunakan aquades selama 5 menit, dan setelah direndam dengan

aquades kemudian direndam dengan asam asetat 45% selama 15 menit, dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan asam asetat 45% dan HCL 1N dengan perbandingan 3:1 selama 15 menit pada suhu waterbath 60°C, setelah itu akar dipindahkan pada gelas arloji dengan posisi ujung akar dibagian dalam gelas arloji, teteskan aceto orcein 2 % dan biarkan selama 20-30 menit, lalu ujung akar yang telah ditetesi aceto orcein kemudian dipindahkan pada gelas objek, kemudian dipotong 1-2 mm dan ditetesi lagi dengan aceto orcein 2% dan tutup dengan gelas penutup, setelah itu lewatkan preparat diatas api bunsen 2-3 kali, kemudian diketuk dengan ujung pensil berkaret (Squash), lalu tekan dengan ibu jari dengan menggunakan tissue kemudian hasil squasing diolesi dengan kutek bening agar tidak ada udara maupun kotoran yang masuk kemudian amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x-1000x. Jika didapat penyebaran kromosom yang baik, kemudian dilakukan pemotretan.

3.6 Analisis Data

Data pengamatan morfologi dan anatomi kecuali warna daun dan sitologi dianalisis dengan menggunakan sidik ragam pada taraf 5% dan 1 %, apabila berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5 %.

$$\text{Rumus BNT}_{0,05} = \text{TABEL BNT} \frac{\sqrt{2KTg}}{r}$$

Tabel 1. Anova

Sumber Ragam	Db	JK	KT	F hit	F tabel
Ulangan	r-1	JK			
Perlakuan	p-1	JKP	JKP/DBP		
Galat	(p-1) (r-1)	JKT-JKU-JKP			
Total	(p.r) -1	JKT			